

黄柏中总生物碱的提取及测定方法研究

陈月圆¹, 李典鹏^{1*}, 高江林²

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西桂林 541002)

摘要: 对黄柏中总生物碱的提取、纯化条件进行了优化研究,其提取最佳工艺为醇提取、大孔树脂吸附纯化法。同时采用柱层析—紫外分光光度法对产品进行含量测定,并对测定方法进行了系统的方法学考察。该方法重现性好,准确度高。

关键词: 黄柏; 提取工艺; 含量测定

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2003)06-0565-03

Study on extraction and determination of total alkaloid of cortex *Phellodendri*

CHEN Yue-yuan¹, LI Dian-peng^{1*}, GAO Jiang-lin²

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China; 2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co. LTD, Guilin 541002, China)

Abstract: The article studied the extraction process and the purification condition of the total alkaloid of cortex *Phellodendri*. The results show that the optimum extraction process is the alcohol extraction, macroporous resin absorption purification method. In addition, the products are assayed by Column Chromatography combined with UV-spectrophotometry, and we make a systematic study on methodology on the Analysis Method. The method is simple, accurate and reliable.

Key words: cortex *Phellodendri*; extraction process; determination

黄柏系芸香科(Rutaceae)植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid)及黄柏树(*Phellodendron amurense* Rupr)的干燥树皮。树皮中含有小檗碱(Berberine)、木兰花碱(Magnoflorine)、黄柏碱(Phellodendrine)等多种生物碱及内酯、甾醇等,其中以小檗碱为主要药效成分(中华人民共和国药典, 2000)。其性寒、味苦,具有清热燥湿、泻火解表、退虚热之功效。为了充分利用黄柏树,开发我国特产资源,我们对黄柏中总生物碱的提取工艺进行了比较研究,探讨出了一条理想的生产工艺。测定小檗碱含量的方法较多,有高效毛细管电泳法(彭艳梅, 1997)、薄层层析—紫外分光光度法(孔少仪, 2000)、TLC法和HPLC法(吕林等, 1990)等等。其中高效毛细管电泳法和HPLC法所需仪器较昂贵、测定成

本高;而TLC法和薄层层析—紫外分光光度法操作繁琐,且准确率低。我们采用柱层析—紫外分光光度法检测黄柏提取物中总生物碱的含量,并考察了该方法的重现性、回收率、准确度等。实验证明该方法操作简便、重现性好、准确度高。

1 实验材料

仪器:UV-210 紫外分光光度计(日本岛津)、超声波仪、层析柱 1 cm×30 cm(上海玻璃仪器厂)。试剂:中性氧化铝(100~200 目,上海五四农场化学试剂厂);盐酸、95%乙醇、甲醇均为分析纯;盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所);A型大孔树脂(河北沧州产)。黄柏药材:由桂林三金药业集团科研所提供。黄柏提取物:本所植化室自制。

2 实验方法和结果

2.1 黄柏的提取纯化工艺

2.1.1 工艺流程 黄柏原料(1)破碎→称重→(2)提取→过滤→(3)滤液经不同方式分离纯化→成品。工艺步骤说明:(1)黄柏原料由桂林三金药业集团科研所提供,破碎成30目左右的样品粉末。(2)在提取过程中所采用的3种提取溶剂,分别是水、70%乙醇、0.3% H₂SO₄ 溶液,提取2次,每次1 h。(3)在黄柏的提取纯化工艺中,最关键的是分离纯化这个工序,我们采用盐析、大孔树脂吸附、乙醇沉淀3种纯化方法。在盐析工艺中,首先加入2%滑石灰,用饱和石灰水调pH至10,静置,过滤后滤液用25% HCl调pH至2,加入NaCl,放置24 h,抽滤,干燥得成品。在大孔树脂吸附纯化工艺中,首先对树脂型号从吸附量大小、洗脱难易程度、树脂再生处理难易程度等方面做了选择,最后采用河北沧州产的A型大孔树脂,该树脂黄柏中总生物碱吸附性好、洗脱也很容易,上样流速控制在柱的最大流速的1/4,先用低醇预洗,再用70%的乙醇洗脱,减压回收乙醇,干燥得成品。在醇沉过程中,先将提取液浓缩至膏状,加入95%乙醇沉淀,过滤,滤液减压回收乙醇,干燥得成品。

2.1.2 黄柏三种提取溶剂的综合评价 以提取300 g黄柏原料计,原料含量以盐酸小檗碱计为3.65%。对黄柏3种提取溶剂作综合评价(表1)(分离纯化用大孔树脂吸附)。

表 1 不同提取溶剂的结果

Table 1 Results of different extraction solvent			
提取溶剂 Extraction solvent(%)	得率 Yield (%)	含量 Content (%)	总提取率 Extraction rate(%)
水 Water	8.0	26.3	55.2
乙醇 Ethanol	10.1	32.8	84.4
酸水 Acid water	9.0	18.9	36.6

从上表可看出,乙醇作为提取溶剂明显优于其他溶剂。

2.1.3 提取物总生物碱纯化 为了较好的去除杂质、提高总生物碱的含量,我们采用了大孔树脂吸附、盐析、沉淀等方法对黄柏提取物中总生物碱进行分离纯化(表2)(以醇提为提取工艺路线)。

从表2可看出,采用大孔树脂吸附的纯化方法的得率、总提取率高于其他方法。

2.2 黄柏中总生物碱的含量测定

2.2.1 标准曲线的制备 (1)标准溶液的配制:精密

称取盐酸小檗碱对照品5.0 mg,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取该液5.0 mL,置25 mL容量瓶中,加95%乙醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品母液。(2)标准曲线的绘制:精密吸取对照品母液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中,加入0.1 mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀。以95%乙醇为空白,在紫外最大吸收波长345 nm下测定吸收值,以吸收值A为纵坐标,浓度C为横坐标,得出回归方程 $A = 6.4558C$, $R = 0.9998$ 。

2.2.2 样品溶液制备 (1)黄柏提取物供试液:精密称取提取物50.0 mg,置于50 mL容量瓶中,先加入少量甲醇,超声波振荡溶解,再用甲醇稀释至刻度,摇匀备用。(2)黄柏药材供试液:取黄柏原料于70~80℃烘干,研碎成细粉末,过40目筛。精密称取粉末1.000 g,置于100 mL锥形瓶中,加入甲醇30 mL,超声波振荡下提取15 min,过滤,滤渣重复提取2次,滤液合并,甲醇定容稀释至100 mL容量瓶中,摇匀备用。

表 2 不同纯化方式结果

Table 2 Results of different purification conditions			
纯化方法 Purification conditions	得率 Yield (%)	含量 Content (%)	总提取率 Extraction rate(%)
盐析 Salting-out	1.75	96.4	46.2
大孔树脂吸附 Macroporous resin absorption	10.3	30.8	84.4
乙醇沉淀 Ethanol precipitation	7.3	26.1	52.2

表 3 样品测定结果

Table 3 Results of determination of different samples							
样品 Sample	黄柏原料 Law material	提取物 Extraction					
		I	II	III	IV	V	VI
含量 Content (%)	3.65	26.8	26.1	64.7	18.7	32.8	42.3

2.2.3 样品含量测定 精密吸取2.2.2项下得供试液各5.0 mL,置于中性氧化铝柱(5 g,湿法装柱,乙醇预洗),95%乙醇洗脱,收集洗脱液,置于25 mL容量瓶中,用95%乙醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取2.0 mL此液,置于10 mL容量瓶中,加入0.1 mol/L盐酸溶液稀释至刻度,紫外345 nm下测定吸收度,按照标准曲线计算含量(表3)。

2.2.4 加样回收率测定 精密称取已知含量样品25.0 mg,置于25 mL容量瓶中,同时加入盐酸小檗碱对照品2.5 mg,甲醇超声振荡溶解,稀释至刻度,摇匀。精密吸取此液5.0 mL上中性氧化铝柱,按2.2.3项下的方法操作(表4)。

表 4 加样回收率实验结果
Table 4 Results of added recovery

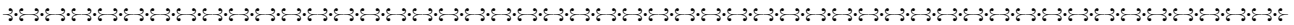
编号 No.	加入量 Added amount(mg)	测得量 Found amount(mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery(%)
1	2.5	2.57	103	—
2	2.5	2.47	99	102
3	2.5	2.60	104	

2.2.5 方法重现性考察 对同一样品分别按样品处理方法和测定方法测定(表 5)。

3 小结

(1)以小檗碱为指标,对黄柏 3 种提取溶剂、3 种分离纯化方法的提取物中总生物碱含量的工艺路线的产品得率、含量及方法总提取率进行了综合评价,总的来说,醇提取、大孔树脂吸附方法明显优于其他方法。

(2)本测定方法相比以前经典方法操作更简便



(上接第 552 页 Continue from page 552)

and their potential for the production of Azadirachtin[J]. *Phytoparasitica*, **26**(1): 47—52.

Chen F, Zhang Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on gulcose for phycocyanin production using a fed-batch system [J]. *Enzyme Microb Technol*, **20**: 221—224.

Manisha Sanyal, Aishish Das, Mili Banerjee, *et al.* 1981. *In vitro* hormone induced chemical and histological differentiation in stem callus of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, **19**: 1 067—1 068.

Manisha Sanyal(Sarkar), Anuradha Mukherji, P. C. Datta. 1988. Glycine on *in vitro* biosynthesis of nimbin and β -sitosterol in tissues of *Azadirachta indica* [J]. *Current Science*, **57**(1): 40—41.

Murthy BNS, Praveen K. Saxena. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem(*Azadirachta indica* A. Juss)[J]. *Plant Cell Reports*, **17**: 469—475.

Panda AK, Mishira S, Bisaria VS. 1992. Alkaloid production by plant cell suspension of *Holarrhena antidysenterica*: I. Effect of major nutrients[J]. *Biotechnlo Bioeng*, **39**: 627—630.

Qi SY(戚树源), Lin LD(林立东), Liang SZ(梁世中), *et al.* 1997. Cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon* in a 10-litre airlift loop bioreactor(10 升气升环流式生物反应器培养紫草细胞)[J]. *Journal of Tropical and Suptropical Botany*(热带亚热带植物学报), **5**(2): 80—84.

Qi SY(戚树源), Ye QF(叶勤法), Lin LD(林立东). 1998. Plant regeneration of callus tissue derived from *Azadirachta indica*(印楝愈伤组织培养和植株再生)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), **19**(1): 77—81.

迅速,方法准确度好,稳定性、重现性好。适用于黄柏中总生物碱工业化生产中的含量控制。

表 5 重现性实验结果
Table 5 Results of reproducibility tests

编号 No.	含量 Content(%)	平均含量 Average content(%)	CV (%)
1	33.4	—	—
2	33.2	—	—
3	33.7	33.3	0.7
4	33.1	—	—
5	33.2	—	—

参考文献:

中华人民共和国药典. 2000. 一部. 化学工业出版社, 548.

孔少仪. 2000. 黄柏胶囊中小檗碱的含量测定[J]. *中医药研究*, **16**(3):48—49.

吕琳,王永奇. 1990. TLC 和 HPLC 法测定小檗碱在黄柏中的分布[J]. *中草药*, **21**(5): 11—13.

彭艳梅. 1997. 两种方法对黄柏各部位小檗碱含量测定[J]. *中草药*, **10**(28): 599—601.

Rangaswamy NS, Promila. 1972. Morphogenesis of the a-dult embryo of *Azadirachta indica* A. Juss [J]. *Z. Pflanzenphysiol*, **67**: 377—379.

Saleem Ahmed, Michael Grainge. 1986. Potential of the Neem Tree (*Azadirachta indica*)[J]. *Economic Botany*, **40**(2): 201—209.

Shirish R Yakkundi, R Thejavathi, B Ravindranath. *et al.* 1995. Variation of azadirachtin content during growth and storage of Neem *Azadirachta indica* seeds[J]. *J Agric Food Chem*, **43**: 2 517—2 519.

Treat WJ, Engler CR. 1989. Culture of photomixotrophic soybean and pineina modified fermentor using a novel impeller[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**: 1 191—1 202.

Virenda K, Gautam, Kanan Nanda, shrish C. Gupta. 1993. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss—a medicinal tree[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **34**: 13—18.

Yu LJ(余龙江), Cai YJ(蔡永君), Lan WZ(兰文智). 2002. Research on the stability of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures(红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(1): 85—88.

Zhao SH(赵善欢), Zhang YG(张业光), Cai DZ(蔡德智), *et al.* 1989. Preliminary report of neem tree introduction and cultivation in China(印楝引种试验初报)[J]. *Journal of South China Agricultural Unirersity*(华南农业大学学报), **10**(2): 34—39.

Zhong JJ, Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perrilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production; Effects of sucrose concentration and inoculum size[J]. *Enzyme Microb Technol*, **17**: 1 073—1 079.

作者: 陈月圆, 李典鹏, 高江林
作者单位: 桂林三金药业股份有限公司, 广西桂林, 541002
刊名: 广西植物 **ISTIC** **PKU**
英文刊名: GUIHAIA
年, 卷(期): 2003, 23 (6)
被引用次数: 47次

参考文献(4条)

1. 国家药典委员会 中国药典2000年版(一部)
2. 孔少仪 黄柏胶囊中小檗碱的含量测定 2000 (03)
3. 吕琳;王永奇 TLC和HPLC法测定小檗碱在黄柏中的分布 1990 (05)
4. 彭艳梅 两种方法对黄柏各部位小檗碱含量测定 1997 (10)

本文读者也读过(10条)

1. 俞丹. 尹莲. YU Dan. YIN Lian 黄柏总生物碱提取工艺的优化研究[期刊论文]-海峡药学2008, 20 (7)
2. 刘丽梅. 王瑞海. 陈琳. 陈韩英. 杨立新. 刘风华. 许剑琴 黄柏总生物碱提取方法及工艺研究[期刊论文]-中国实验方剂学杂志2010, 16 (2)
3. 祝晨蓀. 林朝展. 莫建霞 HPLC法测定黄柏药材中小檗碱与黄柏碱的含量[期刊论文]-中药新药与临床药理 2004, 15 (4)
4. 袁黎明. 吴平. 夏滔. 谌学先 高速逆流色谱制备分离中药黄柏中的生物碱[期刊论文]-色谱2002, 20 (2)
5. 张焯. 崔征. 周海燕. 董娥 高效液相色谱法测定关黄柏不同采收期及黄檗不同部位的小檗碱、巴马汀含量[期刊论文]-沈阳药科大学学报2003, 20 (3)
6. 徐宁 紫外分光光度法测定黄柏中盐酸小檗碱含量[期刊论文]-中国药业2010, 19 (12)
7. 张倩. 蔡丽芬. 钟国跃 HPLC法同时测定黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[会议论文]-2008
8. 范家佑. 张松竹. JIA You-fan. SONG Zhu-zhang 黄柏中总生物碱的提取工艺优化[期刊论文]-井冈山大学学报(自然科学版) 2010, 31 (5)
9. 张英. 李卫民 大孔树脂AB-8动态吸附黄柏总生物碱的工艺研究[期刊论文]-广州中医药大学学报2010, 27 (3)
10. 周德庆. 郭志雄. 罗泽渊. 张爱军. 黄志芳 HPLC法测定黄柏中黄柏碱的含量[期刊论文]-中成药2003, 25 (12)

引证文献(34条)

1. 张莉, 冯晓元, 丁立孝, 李文生 黄柏提取物对采后梨果实PAL、CHT及GLU的诱导[期刊论文]-食品研究与开发 2007 (02)
2. 味连及副产物有效成分和氨基酸含量的研究[期刊论文]-中药材 2005 (09)
3. 王颖, 刘志东, 曹晴, 李琳 地榆四黄散的提取工艺优化及凝胶剂的制备[期刊论文]-天津中医药 2012 (01)
4. 曾丽娟, 李琦, 刘志国, 马寅众, 付云洁 麦角碱的提取与分离纯化[期刊论文]-武汉工业学院学报 2010 (03)
5. 鲁沁 采用正交试验法优选黄柏的提取工艺探析[期刊论文]-当代医药论丛 2014 (01)
6. 赵丹庆, 刘楠, 张力, 包玉敏 蒙药材通经草中盐酸小檗碱的提取与含量的测定[期刊论文]-内蒙古民族大学学报(自然科学版) 2013 (03)
7. 王绪英, 左经会, 林长松, 向红 优选不同溶剂对永思小檗中盐酸小檗碱提取工艺[期刊论文]-山东农业大学学报

8. 曾丽娟, 李琦, 刘志国, 马寅众, 付云洁 麦角碱的提取与分离纯化[期刊论文]-武汉工业学院学报 2010(03)
9. 刘钊圻, 叶萌, 林海建, 赵敏 黄柏加工方法的优化研究[期刊论文]-林业实用技术 2007(06)
10. 菲鲁热·艾尼瓦尔, 汗泥沙·肉孜, 帕提古丽·马合木提 新疆红果桑果实总生物碱的提取工艺研究[期刊论文]-食品科学 2009(22)
11. 刘廷岳, 聂素双, 王翔, 李腾飞, 高学良 正交法优化离子交换纤维提取纯化小檗碱的工艺[期刊论文]-北京服装学院学报(自然科学版) 2012(02)
12. 张英, 李卫民, 高英 大孔树脂AB-8对黄柏提取液中总生物碱的吸附行为研究[期刊论文]-南方医科大学学报 2010(06)
13. 张英, 李卫民 大孔树脂AB-8动态吸附黄柏总生物碱的工艺研究[期刊论文]-广州中医药大学学报 2010(03)
14. 严雯, 汗泥沙·肉孜, 帕提古丽·马合木提 槲寄生果实中生物碱粗提物的抑菌作用研究[期刊论文]-食品科学 2009(23)
15. 付婷婷, 吴建元, 王黎, 马瑶, 王莹, 刘颖, 丁虹 从中药筛选治疗阴道炎的抗菌组方[期刊论文]-中药材 2006(09)
16. 喻朝阳, 王晓琳 生物碱提取与纯化技术应用进展[期刊论文]-化工进展 2006(03)
17. 薛广厚, 范海延, 李航, 高璐, 李伊夫 生物碱在植物源农药中的应用研究进展[期刊论文]-北方园艺 2009(06)
18. 王玥, 杜守颖, 戴俊东, 吴清, 肖瑶, 袁航, 戎堃, 李慧云, 赵静宜 黄柏中盐酸小檗碱的闪式提取工艺研究[期刊论文]-中国药业 2013(06)
19. 陈度煌 苦参、百部生物碱的提取及活性研究[学位论文]硕士 2008
20. 玄玉实 高效制备色谱法分离制备菱角壳中生物碱的研究[学位论文]硕士 2005
21. 张宏浩 白屈菜活性物质提取工艺及杀虫活性的研究[学位论文]硕士 2007
22. 马爱瑛 生物碱的提取与分离[期刊论文]-固原师专学报 2006(03)
23. 陆黎明 复方黄柏颗粒药动学与药效学的研究[学位论文]硕士 2006
24. 陶华明 妇炎康分散片的研制及丹参中丹酚酸B的分离纯化研究[学位论文]硕士 2006
25. 胡志国 卵叶娃儿藤生物碱的提取及其活性功能研究[学位论文]硕士 2007
26. 刘钊圻 黄柏采收与加工方法的优化研究[学位论文]硕士 2007
27. 王欣 博落回中生物碱成分的研究Ⅱ[学位论文]硕士 2005
28. 张静 长春花吲哚生物碱检测的方法及其分离纯化[学位论文]硕士 2010
29. 胡晶红 苦参生物碱的提取及氧化苦参碱的纯化[学位论文]硕士 2007
30. 周贤春 新疆欧洲鳞毛蕨中活性成分-生物碱的初步研究[学位论文]硕士 2007
31. 邹露 篦子三尖杉的组织培养及生物碱检测[学位论文]硕士 2009
32. 冯敏 黄连花茎成分分析和功能评价[学位论文]硕士 2006
33. 陈韩英 黄柏生物碱及其复方对猪和小鼠热应激中IL-4/IFN- γ 的调控机制[学位论文]博士 2007
34. 李俶 槲寄生中生物碱与黄酮类化合物的提取、纯化及黄酮类化合物的生物活性研究[学位论文]博士 2007